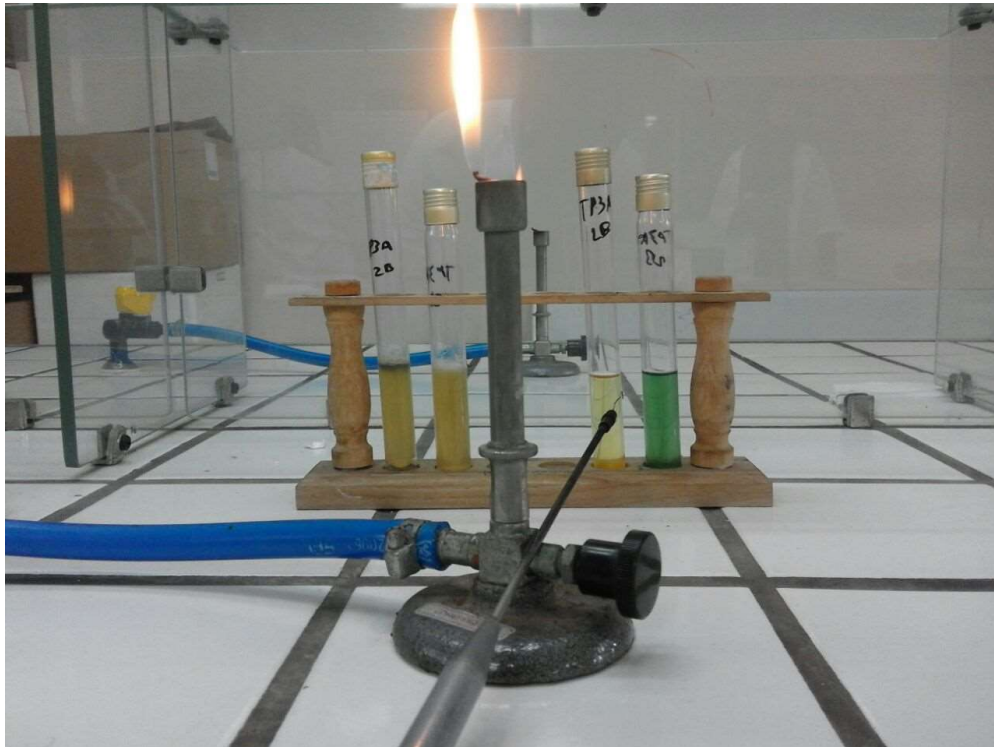


Compte Rendu:

Microbiologie

TP3A



Réaliser Par :

EL ALLALI Zouhair

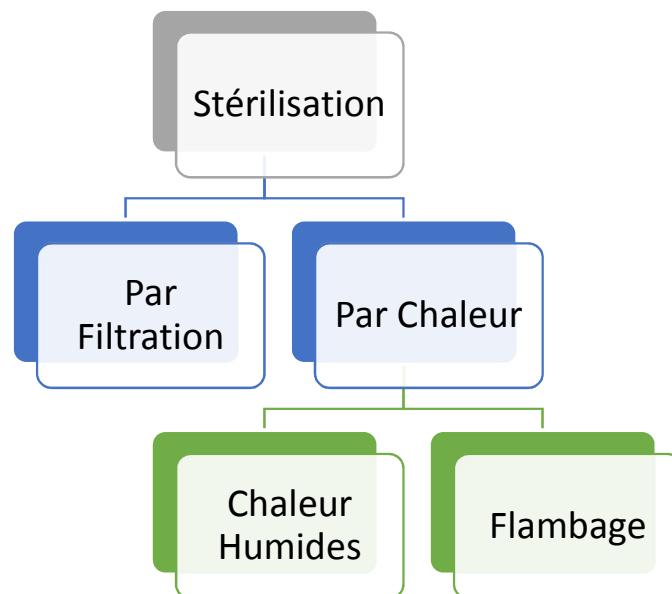
EL AZZAB Elmehdi

Séance 1

1. Application N°1 : Stérilisation

Les composants des milieux nutritifs et des solutions nutritives ainsi que les instruments de travail utilisés pour la confection de ces constituants sont infectés par des germes de types variés. Par suite de leur développement ces germes peuvent rapidement souiller les substrats nutritifs préparés. Ces substrats doivent donc être stérilisés immédiatement après leur préparation.

Donc la stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet, et ce de manière durable. En microbiologie, le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes. Il existe deux grands moyens de Stérilisation :



A. Stérilisation Par Chaleur

La chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « sèche » ou humide.

a. Stérilisation par flambage :

- ✓ Le passage dans la flamme (bec BUNSEN) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur.
- ✓ Four pasteur : C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques

(instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières.

b. Stérilisation par Chaleur humide : La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités

- La stérilisation à l'autoclave
 - La Pasteurisation
 - La Tyndallisation
- ✓ Autoclave : c'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.
 - ✓ Pasteurisation : la pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.
 - ✓ Tyndallisation : La tyndallisation est une série de 3 chauffages bref à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant. Par exemple la destruction des pathogènes du lait se fait par un cycle de 63°C pendant 30 minutes suivie de 73°C pendant 15 minutes.

B. La filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm. Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre. Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés aromatiques, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques.

Protocole expérimentale :

- 1- Stérilisation par flambage : une boîte de Pétri contenant le GN sera ensemencée sur sa moitié avec anse non stérile et l'autre moitié sera ensemencée après stérilisation de l'anse.
- 2- Stérilisation par chaleur humide : de la même manière, sur une boîte de Pétri partagée en 2 de GN, en ensemence, avec l'ose, à partir une solution bactérienne non autoclavée la moitié de la boîte, et après autoclavage de cette suspension, on ensemence la deuxième partie de la boîte.

 Observation et interprétation des résultats

1. Flambage

Observation :

Pour la partie qui as était ensemencé avec le fil droit sans flambage, on remarque croissance des colonies de bactéries mais dans les zones qui on était ensemencé par le fil droit après flambage on ne remarque aucunes colonies.

Résultat :

Donc on peut utiliser le flambage pour stérilisé les matériels utilisé dans laboratoire.



2. Autoclavage

Observation :

On remarque une croissance bactérienne dans la zone ensemencée par la suspension non autoclavée mais la zone autoclavée par la suspension autoclavée reste propre.

Résultat :

L'autoclavage est une moyenne efficace pour la stérilisation des suspensions



2. Application N 2 : Transvasement Stérile

Protocole expérimentale :

A l'aide d'une pipette Pasteur et à partir d'un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif, transvaser la moitié du contenu dans un tube vide.

Mettre dans l'étuve à 37°C pendant une nuit.

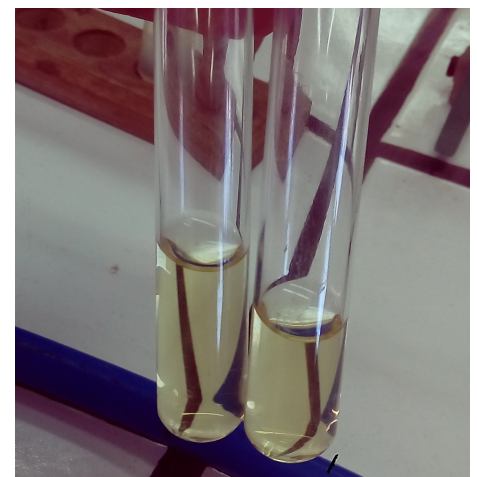
Observation et interprétation des résultats

Observation :

On ne remarque aucun trouble dans les deux tubes.

Interprétation :

On peut transvaser les bouillon nutritive d'un milieu à un autre sans les contaminés par le transvasement stérile.



3. Application N 3 : Méthode d'ensemencement

L'ensemencement est un geste routinier de bactériologie qui consiste à porter des bactéries dans un milieu de culture « neuf ». Il a pour but de favoriser la multiplication bactérienne ou de conserver les souches etc... il se réalise stérilement avec une anse ou avec une pipette Pasteur stérile :

- L'anse de platine est portée au rouge.
- Les pipettes Pasteur et l'ouverture des récipients sont stérilisées à la chaleur sèche en les passant à la flamme.

1- Ensemencement dans un bouillon

Ensemencer un tube de bouillon à partir d'une culture en milieu liquide à l'aide d'une anse chargée de l'inoculum.

2- Ensemencement sur gélose en boîte de Pétri

Ensemencer une gélose en boîte de Pétri à partir d'une culture en milieu liquide.

But de La méthodes des quadrants :

La méthode d'ensemencement en quatre quadrants est la méthode de référence pour la plupart des prélèvements en microbiologie. Elle permet à la fois une estimation semi-quantitative du nombre de germes contenus dans un prélèvement et l'obtention de colonies isolées. Le principe est un épuisement séquentiel du matériel de départ. L'automatisation des ensemencements au moyen du **WASPI** (Walk Away Specimen Processor) permet d'obtenir une reproductibilité des mises en culture et représente ainsi une opportunité pour l'investigation de cette méthode d'ensemencement.

Cette Méthode est la plus classique. Elle consiste à diviser une boîte de Pétri en deux (50 % et 50 %), puis de diviser de nouveau par deux une moitié afin d'obtenir 3 cadrans de 50 %, 25 % et 25 %. Sur le plus grand cadran une petite quantité d'inoculum est posée puis étalée. Ensuite on retourne la boîte afin d'étaler les bactéries sur un cadran plus petit, puis on retourne afin d'ensemencer le dernier petit cadran. Les stries doivent être serrées et la pipette ou l'anse de platine doit être flambée entre chaque cadran pour de meilleurs résultats. Il est aussi recommandé de ne pas passer deux fois au même endroit et de ne pas trop revenir "en arrière" lorsque l'on fait pivoter la boîte, sinon l'anse risque de se surcharger et l'isolement sera moins réussi.

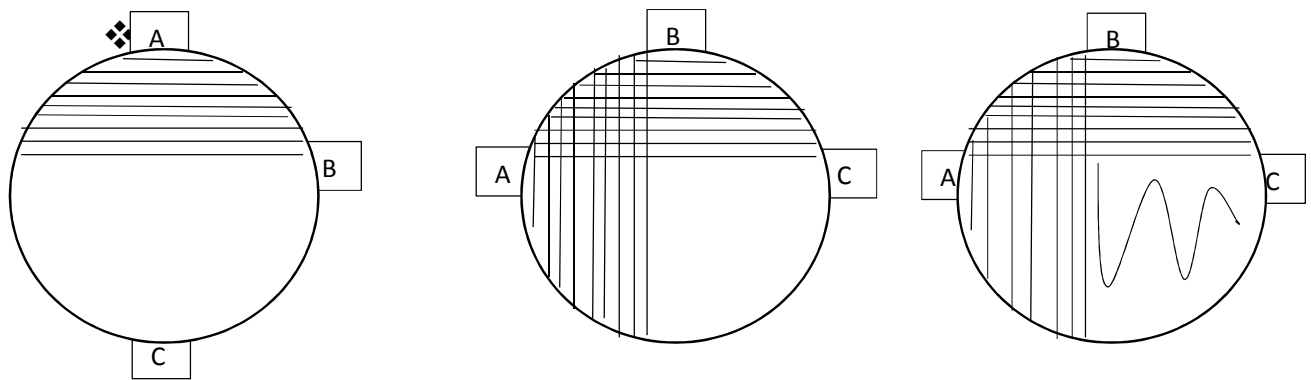
Protocole expérimentale

○ Sur la boîte de Pétri

Ensemencer une gélose en boîte de Pétri à partir d'une culture en milieu liquide. Procéder par la technique des quadrants :

- ❖ Prélever la suspension bactérienne avec l'anse de platine stérilisée, déposer le contenu de l'anse « pleine » en un point périphérique à la surface du milieu en l'étalant sur un cm² environ.

- ❖ Avec l'anse stérilisée et refroidie, tenue comme un crayon, réaliser des stries serrées et parallèles sur une moitié de la boîte de Pétri.
- ❖ Après avoir tourné la boîte d'un quart de tour, on effectue un nouvel ensemencement (en partant du point b) sur une moitié de boîte, par une série de stries perpendiculaires aux premiers et disséminant les bactéries contenues dans le quadrant.
- ❖ Avec l'anse stérilisée, onensemencera de la même façon en partant cette fois du point c (après un nouveau quart de tour) le dernier quadrant 4 en disséminant les bactéries déposées sur le quadrant 3.
- ❖ Fermer le couver et stérilisé la pipette.
- ❖ La boîte de Pétri ensemencée est immédiatement retournée et incubée une nuit à l'étuve à 37°C.



1. Résultats

On remarque des stries de colonies qui se situent suivent nos stries sur la boîte de Pétri.



4. Application N°4 : Les contaminants des différents biotopes

1- Flore de L'air

Il est intéressant de connaître la qualité de germes existant en suspension dans l'aire, germes peuvent être à l'origine d'une contamination des produits ou matériel contenu dans le local.

2- Flore de la peau

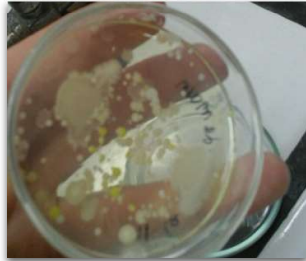

La peau est couverte de germes appartenant à la flore commensale. Celle-ci bénéfique et nous protège la plupart du temps contre l'envahissement par d'autres germes indésirables.

Protocole expérimentale

❖ Flore de L'air

- ✓ **Etiqueter 3 boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive**
 - N°1 air extérieur 30mn.
 - N°2 air laboratoire 90mn.
 - N°3 projections oropharyngées.
- ✓ **Placer les 3 boîtes dans les conditions suivant :**
 - N°1 ouverte, à l'extérieur du laboratoire dans un endroit abrité pendant 30mn.
 - N°2 ouverte, à l'intérieur du laboratoire, sur paillasse pendant 90mn.
 - N°3 ouverte à quelques cm environ de la bouche d'une personne qui, pour l'occasion, récitera un texte. La boîte doit être placée de façon à rencontrer les particules émises (perpendiculairement au trajet de ces particules).
- ✓ **Placer les boîtes de Pétri retournées à l'étuve à 37°C.**

- ✓ Examiner les boîtes après 48h d'incubation.

La Front	La Peau	L'air Intérieur
		
<p>La présence de plusieurs coloniers:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ronde, opaque et blanche : Staphylocoque. -Jaune et opaque. 	<p>Des colonies blanc et très petite.</p> <p>Des Coloniers jaune et ronde, bombé.</p>	<p>Petites colonies de couleur orange, jaune et blanche de forme circulaire :</p> <p>Staphylocoque , Microcoque.</p>

❖ Flore de la peau

- ✓ Placer 2 écouvillons stériles dans 2 tubes contenant 1mL d'eau stérile. Essorer contre la paroi du tube. Frotter chaque écouvillon à la surface d'un endroit différent : La peau et La front.
- ✓ Après ensemencé la gélose nutritive par l'écouvillon.
- ✓ Et à la fin on obtient 2 boîtes de Pétri.
- ✓ On les placer à l'étuve et incuber 48h à 30°C.

+ Observation et interprétation des résultats

5. Application N°5 : Obtention d'une culture pure à partir d'un mélange de bactérie

Les cultures bactériennes peuvent contenir un mélange de plusieurs bactéries, qu'il est nécessaire de séparer avant toute identification. L'obtention de colonies isolées ou isolement, n'est réalisable en pratique qu'en milieux solides.

Les Milieux à ensemencer :

- ✓ **Gélose ordinaire (TSA) :** ce milieu va permettre la croissance simultanée de *Escherichia coli* et de *Staphylococcus*. Par contre, les milieux sélectifs vont favoriser sélectivement la croissance de l'un ou de l'autre germe.
- ✓ **Gélose de Mac Conkey :** La gélose Mac Conkey est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries. En effet, elle contient des agents sélectifs qui freinent le développement des bactéries à Gram positif : cristal violet et sels biliaires. Ce milieu nous permet à recherche de *Salmonella*, *Shigella* et ECEP (*Escherichia coli* entéropathogènes) dans les selles.

- ✓ **Gélose Chapman** : est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

But

Mise en évidence l'importance des constituants des milieux nutritifs dans la sélection de certains bactéries et l'élimination d'autre.

Protocole expérimentale

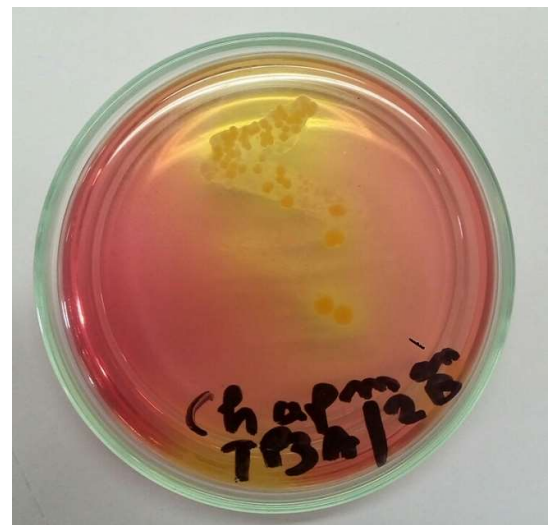
Prélever une goutte de la suspension à l'aide d'une anse. Etaler cette goutte par des stries successives à la surface de la gélose contenue dans une boîte de Pétri ; au fur et à mesure la charge bactérienne diminue sur l'anse. Le nombre de germes déposé est de plus en plus petit.

Mettre une nuit à 37°C.

Résultats et interprétation



On remarque croissance bactérienne une niveau du trajet d'ensemencement on peut pas faire un examen macroscopique parce qu'on pas des colonies isolés. Mais d'après la nature des constituants de milieu on suppose que le type de bactérie est E.C.



une autre fois on remarque un croissance bactérienne au niveau du zone d'ensemencement, ce sont des colonies ronde, opaque jaunes et parfois blanches, donc ses derniers sont des staphylococcus.

6. Application N°6 : Identification microscopique après Coloration Gram

L'examen est effectué sur des frottis séchés et fixés. Il est indispensable à l'étude précise de la morphologie, voire de la structure des bactéries. Plusieurs types de coloration peuvent être réalisés :

- ✓ Colorations usuelles permettent une première classification des espèces bactériennes. La coloration peut être simple comme la coloration au bleu de méthylène ou complexe comme la coloration Gram.

- ✓ Colorations spéciales permettent la mise en évidence des détails de la structure bactérienne (cils, spores, capsules etc.) ou l'observation de certaines bactéries difficilement colorables par les techniques usuelles.
- Dans notre TP on va faire une coloration Gram sur :
 1. E. Coli.
 2. Staphylooccus.

❖ *Coloration Gram*

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide et médicalement importante.

La coloration de Gram est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration. Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet ou mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau, les corps cellulaires des bactéries à Gram négatif.

But de manipulation

Déterminer le type des germes, est-ce qu'elles sont Gram⁺ ou Gram⁻.

Protocole expérimental

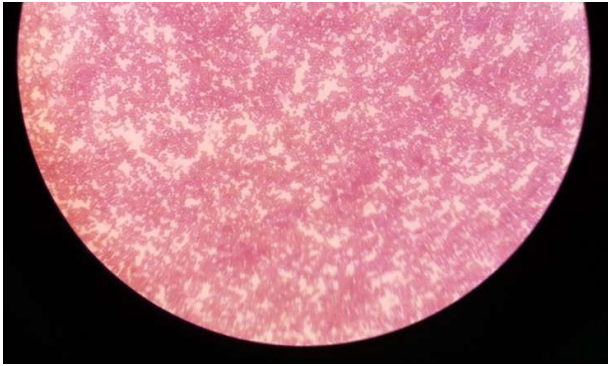
Réalisation du frotti

- Etalement : déposer au centre d'une lame 1 goutte d'eau distillée, dans laquelle on dissocie une très petite quantité de culture prélevée à l'anse. Avec la même anse étaler la suspension bactérienne en un film mince et régulier (en réalisant un mouvement circulaire et régulier).
- Séchage : laisser sécher à la proximité du bec bunsen où en maintenant la lame dans l'air chaud au-dessus de la veilleuse du bec.

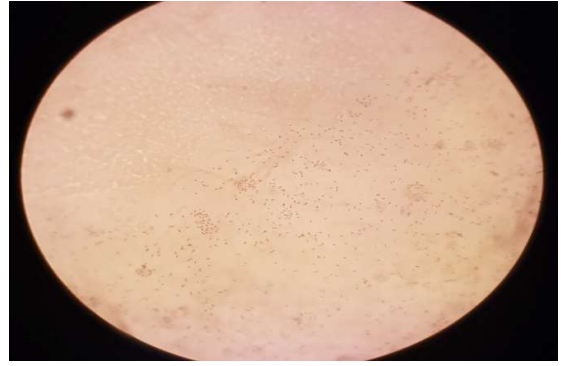
Coloration Gram

- Couvrir le frottis par le violet de gentiane, laisser agir 1 minute.
- Rincer par l'eau.
- Couvrir par lugol, laisser agir pour 2 minutes.
- Rincer avec l'alcool en le versant goutte à goutte sur la lame inclinée.
- Laver abondamment à l'eau.
- Couvrir le frottis de fuch sine. Laisser agir de 30 à 60 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Examiner le frottis sous microscope.

✚ Résultats et interprétation



On remarque une coloration violette ce qui signifie que notre germe est Gram +



On remarque une coloration rose ce qui signifie que notre germe est Gram-

Application N 7 : Détermination du type respiratoire

Pour définir le type respiratoire d'une bactérie on utilise le milieu VF (viande foie) qui a été régénéré et coulé en tubes profonds.

✚ Protocole expérimental

- Ensemencer à la pipette Pasteur boutonnée, plongée jusqu'au fond puis remontée en décrivant une spirale serrée.
- Laisser les tubes jusqu'à leur solidification.
- Incuber à 37°C pendant 1 à 7 jours.

✚ Résultats et interprétation

Pour la lecture des résultats référez-vous à la figure ci-dessous

- ❖ Bactéries aérobies strictes → culture seulement en surface.
- ❖ Anaérobies strictes → culture seulement en profondeur
- ❖ Aéro-anaérobies → sur toute la hauteur

Les 2 germes utilisés sont :

- E. Coli
- Staphylococcus

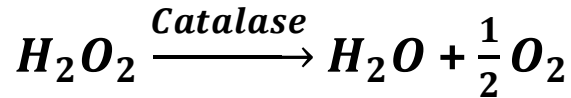
Pendant notre TP et après la manipulation nous avons trouvé 2 résultats :

- La 1^{ère} : toute la culture se situe seulement en surface : Bactérie aérobie → E. Coli.
- La 2^{ème} : la culture se situe sur toute la hauteur : Bactérie aéro-anaérobie → Staphylococcus.

Application N 8 : Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez les germes de la famille des Micrococcaceae (Staphylococcus et Micrococcus) et absente chez les germes de la famille des Streptococcaceae. La recherche de la catalase est particulièrement intéressante pour faire la distinction entre ces germes qui sont tous des Gram⁺.

✚ Réaction étudiée



Ce test est réalisé en recherchant l'activité de la catalase contenue dans les germes d'une culture vis-à-vis de l'eau oxygénée.

✚ Protocole Expérimental

Sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée, quelques colonies de germes sont déposées.

✚ Résultats et interprétations

On remarque le dégagement de bulles de gaz ce qui est indiqué que le test est positif est que notre germe est catalase+

Application N° 9 : Détermination du métabolisme de glucose

L'attaque des glucides aboutit à la formation d'acide, facilement mis en évidence par un indicateur de PH, changeant de couleur entre le PH neutre initial et le PH acide finale.

Le virage de la couleur rouge au jaune du milieu indique l'utilisation du sucre.

✚ Protocole Expérimental

On réalise l'ensemencement d'une souche d'E. coli dans 2 tubes :

- ❖ Premier tube de gélose nutritive additionnée de glucose à 1%.
- ❖ Deuxième tube témoin ne contenant pas de glucose.

Incuber 24h à 37°C.

✚ Résultats et Interprétations



On remarque que notre tube est resté bleu ce qui signifie que on n'a pas utilisation de glucose dans ce tube.

La couleur jaune au-dessous du tube est le résultat des contaminations.

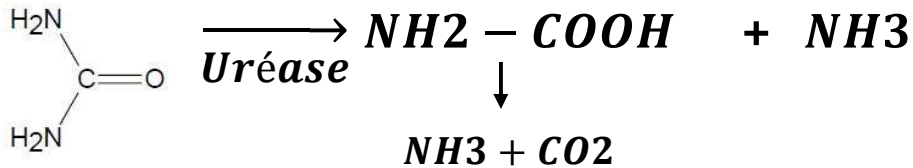


On remarque un changement de couleur ce qui signifie qu'on utilisation de sucre dans notre tube.

Application N 10 : Recherche de l'uréase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme qui décompose l'urée.

L'hydrolyse de l'urée s'accompagne d'une alcalinisation du milieu de culture par accumulation d'un des produits de la réaction : l'ammoniaque. L'augmentation de PH est visualisée par le virage du rose-saumon au rouge de l'indicateur coloré contenu dans le milieu de culture.



📌 Protocole expérimental

- ❖ Ensemencer 1 tube à hémostase contenant 3 à 4 gouttes du milieu urée de Stuart avec une suspension très dense de la bactérie étudiée.
- ❖ Placer au bain-marie à 37°C pendant une nuit.

📌 Résultats et Interprétations



E. coli → un changement de couleur signifie que *E. coli* est uréase +



Staphylococcus → Pas de changement de couleur signifie que *Staph* est Uréase -

Application N 11 : Recherche de la lipase

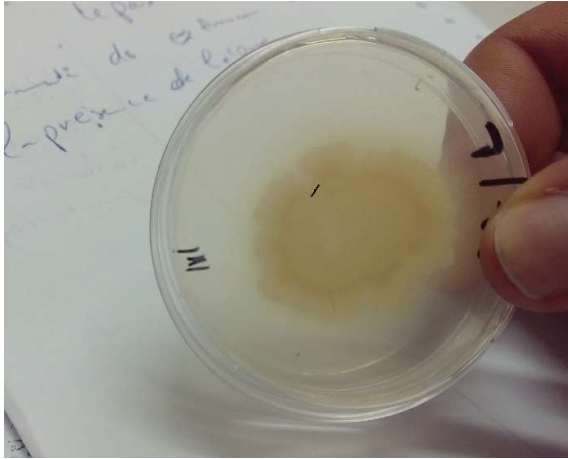
Les lipides sont des esters acides gras à poids moléculaire élevé. La cellule bactérienne, comme toutes les cellules vivantes contient des lipides. Les enzymes microbiennes qui les dégradent (lipase) transforment le substrat en 2 composants, acide gras et alcool.

Une réaction positive se traduit par un halo opaque autour des colonies, dû à la précipitation des acides gras.

📌 Protocole expérimental

Ensemencer chaque germe en touche de 0.5 cm de diamètre une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé, additionné d'une dizaine de gouttes de Tween80 (ester du sorbitol et d'acide gras).

Résultats et Interprétation



Présence d'un halo autour du zone d'ensemencement signifie que notre germe est Lipase ⁺.